

25 JUN 2004

T/JP02/13354

日本国特許庁 20.12.02  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2001年12月28日

REC'D 21 FEB 2003

JPPO

PCT

出願番号

Application Number:

特願2001-399455

[ST.10/C]:

[JP2001-399455]

出願人

Applicant(s):

ヤマサ醤油株式会社

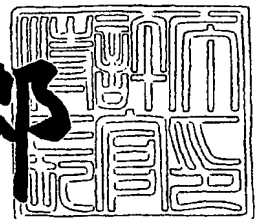
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月 4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3004137

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 YP2000-018

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 19/38

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県銚子市栄町 2 - 1 - 1 2

    【氏名】 野口 利忠

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県銚子市春日町 3 5 - 3

    【氏名】 浜本 智樹

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県山武郡成東町津辺 3 0 - 2

    【氏名】 奥山 潔

【特許出願人】

    【識別番号】 000006770

    【住所又は居所】 千葉県銚子市新生町 2 丁目 1 0 番地の 1

    【氏名又は名称】 ヤマサ醤油株式会社

    【代表者】 濱口 道雄

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 056030

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

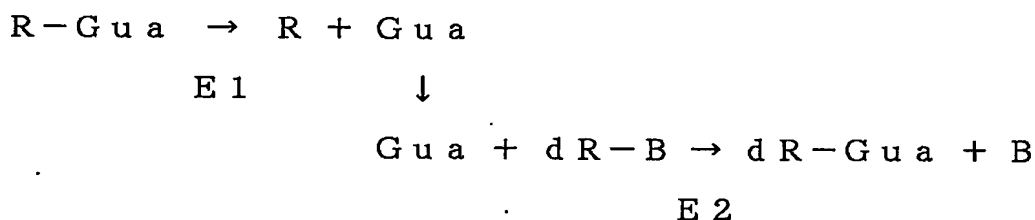
【書類名】 明細書

【発明の名称】 2' - デオキシグアノシンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヌクレオシダーゼ (E 1) とヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ (E 2) とを併用し、下記反応式 (I) によりグアノシン (R-Gua) と 2' - デオキシヌクレオシド (dR-B) から 2' - デオキシグアノシン (dR-Gua) を合成することを特徴とする 2' - デオキシグアノシンの製造法。

【式 1】



(I)

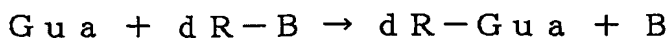
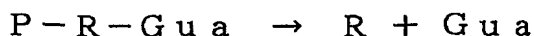
(式中、R はリボース、dR は 2' - デオキシリボース、Gua はグアニン、B は核酸塩基、E 1 はヌクレオシダーゼ、E 2 はヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを示す。)

【請求項 2】 ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼとしてヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ II、2' - デオキシヌクレオシドとして 2' - デオキシピリミジンヌクレオシドを使用する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 2' - デオキシヌクレオシドとしてチミジンを使用する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 ヌクレオシダーゼ (E 1) とヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ (E 2) とを併用し、下記反応式 (II) によりグアノシン 5' - モノリン酸 (GMP) (P-R-Gua) と 2' - デオキシヌクレオシド (dR-B) から 2' - デオキシグアノシン (dR-Gua) を合成することを特徴とする 2' - デオキシグアノシンの製造法。

【式 2】



(I I)

(式中、P-Rはリボースリン酸、dRは2'-デオキシリボース、Guaはグアニン、Bは核酸塩基、E1はヌクレオシダーゼ、E2はヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを示す。)

【請求項5】 ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼとしてヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼI I、ヌクレオシダーゼとしてイノシン酸ヌクレオシダーゼ、2'-デオキシヌクレオシドとして2'-デオキシピリミジンヌクレオシドを使用する、請求項4記載の方法。

【請求項6】 2'-デオキシヌクレオシドとしてチミジンを使用する、請求項4記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼとヌクレオシダーゼとを併用（カップリング）した2'-デオキシグアノシンの製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

2'-デオキシヌクレオシド類は、アンチセンス医薬品（2'-デオキシヌクレオチドのオリゴマーなど）を初めとする種々の医薬品の原料などに有用な化合物である。

【0003】

従来、これらの2'-デオキシヌクレオシド類は、化学的に合成するか、白子などのDNAを酵素分解することにより調製されていたが、化学的合成法では製造コストが高く、またDNA分解法では生成する4種の2'-デオキシヌクレオ

シドの種別の需要と供給のバランスが取れず、効率的ではないという問題があった。

#### 【0004】

そこため、最近、ヌクレオシド・ホスホリラーゼやヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを用いた2'-デオキシヌクレオシド類の合成法が開発されている。

#### 【0005】

上記酵素法は、化学的に容易に合成可能な2'-デオキシウリジンあるいはチミジンを2'-デオキシリボースの供与体とし、化学的に合成可能な核酸塩基もしくはリボヌクレオシドを添加することで、酵素の糖転移反応により目的とする2'-デオキシヌクレオシドを合成しようとするものである。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、4種の2'-デオキシヌクレオシドの中で、塩基であるグアニンの難溶性に起因して、2'-デオキシグアノシンだけがその効率的な製造法が確立されていないのが現状である。この問題を解決するため、最近いくつかの報告がなされている。

#### 【0007】

- (1) 方法1；微生物を酵素源として、2'-デオキシウリジンあるいはチミジンとグアニンを基質として2'-デオキシグアノシンを合成する方法（特開平11-137290）

しかしながら、この方法では、1 g/L (3.6 mM) 程度の2'-デオキシグアノシンしか合成することができない。さらに、グアニンの代りにグアノシンあるいはグアニル酸を基質にしたとしても、2'-デオキシグアノシンの生成量はせいぜい6.3~7.3 g/L (22.8~26.4 mM) 程度である。

さらにこの方法では、大量の培養菌体を必要としたり、反応中グアノシンと2'-デオキシグアノシンを分離精製しなければならないという問題点もある。しかし、グアノシンと2'-デオキシグアノシンはその物性がほぼ同一であることから、グアノシンと2'-デオキシグアノシンの混合物より2'-デオキシグア

ノシンのみを単離精製することはほとんど不可能である。

【0008】

- (2) 方法2 ; 微生物を酵素源として、2' -デオキシウリジンあるいはチミジンとジアミノプリンを基質としてジアミノプリン2' -デオキシリボシドを合成し、これにアデノシンデアミナーゼを作用させてデオキシグアノシンを合成する方法 (特開平11-137289

US6197552)

この方法は、溶解性の高いジアミノプリンを基質とすることで、上記方法1の欠点を改善するものであるが、ジアミノプリンは高価な化合物であり、必ずしも実用的な方法とは言えない。

【0009】

- (3) 方法3 ; チミジンを2' -デオキシリボース供与体としてグアニンとのヌクレオシドホスホリラーゼ反応による2' -デオキシグアノシンを合成する系において、生成するチミンを酵素分解して反応平衡を2' -デオキシグアノシン合成に傾けるという方法 (特開平11-46790、US6017736)

この方法により12~15 mM程度の2' -デオキシグアノシンを合成できることが報告されているが、ウラシルチミンデヒドロゲナーゼなどの特殊な酵素を必要とし、必ずしも汎用性の高い方法とは言えない。

【0010】

- (4) 方法4 ; 2' -デオキシリボース1-リン酸とグアニンを基質とし、ヌクレオシドホスホリラーゼを触媒とした2' -デオキシグアノシンの合成系に塩化カルシウム添加して合成効率を高める方法 (特開2001-26599、WO00/70074)

しかしこの方法は、2' -デオキシリボース1-リン酸の入手が困難であり、収率8 mM程度であり、実用に耐え得る方法ではない。

【0011】

- (5) 方法5 ; 2' -デオキシリボース1-リン酸とグリオキサールグアニンを

基質とし、ヌクレオシドホスホリラーゼを触媒としたグリオキサールデオキシグアノシンを生成し、これをアルカリ分解して2'-デオキシグアノシンを合成する方法（特開2001-269192、EP1138775）

この方法は、2'-デオキシリボース1-リンの入手が困難であり、またどの程度の収率で2'-デオキシグアノシンが得られるかは明確に開示されていない。

#### 【0012】

さらに、本発明者らは前述のヌクレオシド・デオキシリボーストランスフェラーゼの触媒によりグアニンとチミジンあるいは2'-デオキシウリジンを基質とした2'-デオキシグアノシンの合成を報告したが、前述の従来技術と同様、グアニンの難溶性のため、2～3 mM前後の2'-デオキシグアノシンの合成することができなかった（特開2001-46097）。

#### 【0013】

このように、2'-デオキシグアノシンの酵素合成に関しては、種々検討されているものの、未だに実用的な方法が提案されていないのが実状である。

#### 【0014】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、安価なグアノシンあるいはグアノシン5'-モノリン酸と、2'-デオキシグアノシン以外の2'-デオキシヌクレオシドを基質とし、ヌクレオシダーゼとヌクレオシド・デオキシリボーストランスフェラーゼを組み合わせることで、2'-デオキシグアノシンの合成が可能であることを見出した。

#### 【0015】

一般に、ヌクレオシド・デオキシリボーストランスフェラーゼは、溶解状態のグアニンしか基質として認識ないと考えられる。この理由により、グアニンとチミジンあるいは2'-デオキシウリジンを基質とし、ヌクレオシド・デオキシリボーストランスフェラーゼを用いて2'-デオキシグアノシンの合成した場合、2～3 mM前後の2'-デオキシグアノシンしか合成できない。したがって、グ

アノシンあるいはGMPをヌクレオシダーゼでグアニンとリボースあるいはリボース5-リン酸に分解したとしても、グアニンはすぐに不溶状態となって析出し、ヌクレオシド・デオキシリボーストランスフェラーゼの基質とはなりえないと考えられていた。

## 【0016】

しかしながら、まったく驚くべきことに、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼとヌクレオシダーゼとを併用（カップリング）した2'-デオキシグアノシンの製造法には、（1）ヌクレオシダーゼは、不溶状態のグアノシンあるいはGMPが存在したとしても、何の問題もなくグアノシンあるいはGMPを分解し続けること、（2）グアノシンあるいはGMPをヌクレオシダーゼでグアニンとリボースあるいはリボース5-リン酸に分解する際にヌクレオシド・デオキシリボーストランスフェラーゼを反応系に共存させておくことで、生成したグアニンが析出する前にヌクレオシド・デオキシリボーストランスフェラーゼの基質として認識され、速やかに2'-デオキシグアノシンが生成し、グアニンの析出はほとんど観察されないこと、（3）ヌクレオシダーゼは、リボヌクレオシドあるいはリボヌクレオチドのみに作用し、2'-デオキシヌクレオシドには作用しないので、ヌクレオシダーゼにより目的とする2'-デオキシグアノシンが分解されることはないこと、（4）2'-デオキシグアノシンの単離精製の障害となるグアノシンあるいはGMPはヌクレオシダーゼで完全に分解させることが可能であるため、2'-デオキシグアノシンの単離精製が容易なこと、などの数々の利点を有し、2'-デオキシグアノシンを高収率で合成可能な実用的方法であることを確認し、本発明を完成させた。

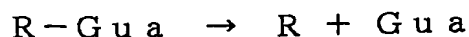
## 【0017】

したがって、本発明は、ヌクレオシダーゼ（E1）とヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ（E2）とを併用し、下記反応式（I）によりグアノシン（R-Gua）と2'-デオキシヌクレオシド（dR-B）から2'-デオキシグアノシン（dR-Gua）を製造することを特徴とする2'-デオキシグアノシンの製造法に関するものである。

## 【0018】

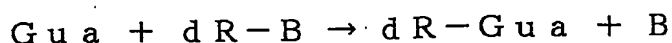


## 【式3】



E 1

↓



E 2

(I)

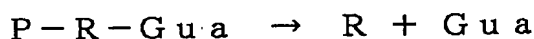
(式中、Rはリボース、dRは2'-デオキシリボース、Guaはグアニン、Bは核酸塩基、E1はヌクレオシダーゼ、E2はヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを示す。)

## 【0019】

また、本発明は、ヌクレオシダーゼ(E1)とヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ(E2)とを併用し、下記反応式(II)によりグアノシン5'-モノリン酸(GMP)(P-R-Gua)と2'-デオキシヌクレオシド(dR-B)から2'-デオキシグアノシン(dR-Gua)を製造することを特徴とする2'-デオキシグアノシンの製造法に関するものである。

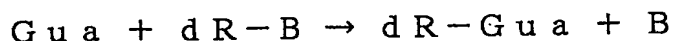
## 【0020】

## 【式4】



E 1

↓



E 2

(II)

(式中、P-Rはリボースリン酸、dRは2'-デオキシリボース、Guaはグアニン、Bは核酸塩基、E1はヌクレオシダーゼ、E2はヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを示す。)

## 【0021】

## 【発明の実施の形態】

本発明は、上記式(I)または式(II)に示す反応により2'-デオキシグアノシンを製造しようとするものである。

上記反応に使用する酵素の組み合わせとしては、上記式 (I) の反応には、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I とプリンヌクレオシドに作用するヌクレオシダーゼの組み合わせが、上記式 (I I) の反応には、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I I とイノシン酸ヌクレオシダーゼの組み合わせがそれぞれ好適である。

#### 【 0 0 2 2 】

このような酵素は、いずれも公知の酵素であり、動物由来、植物由来、微生物由来など特定のものに限定されず、すべての由来のものを使用することができ、酵素調製の簡便性などの点から微生物由来の酵素を使用するのが好都合である。

たとえば、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼは乳酸菌に属する微生物から容易に調製でき、ヌクレオシダーゼは細菌、酵母、かびに属する微生物から容易に調製することができる (Methods in Enzymology, Vol. LI, 446 (1978)、J. Am. Chem. Soc., 79, 630-633 (1957)、J. Biol. Chem., 276, 884-894 (2001)、Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 23, 281-288 (1959) 等参照)。

#### 【 0 0 2 3 】

微生物を培養するための培地としては、これらの微生物が資化可能な炭素源及び窒素源を適当量含有し、必要に応じて金属塩、微量発育促進物質、消泡剤などを添加したものが使用される。具体的には、培地成分としては糖類 (グルコース、サッカロースなど)、天然炭水化物 (糖蜜、廃糖蜜、澱粉、麦、ふすま、米など)、アルコール類、脂肪酸類、炭化水素類など、窒素源としては、肉エキス、酵母エキス、大豆加水分解物など、金属塩としては亜鉛、鉄、マグネシウムなどのリン酸塩、塩酸塩、硫酸塩など、微量発育促進物質としては、ビタミン B 1、ビタミン B 2、ビオチンなどがあげられる。

#### 【 0 0 2 4 】

培養は、通常の液体培養法 (振とう培養、通気攪拌培養、静置培養、連続培養など) あるいは固体培養法によって、20～50℃の温度条件下で必要により通気攪拌しながら、目的とする酵素活性が十分得られるまで行えばよい。

このようにして得られた培養物を用い、使用目的に応じ適宜処理加工したものを酵素調製物として本発明に使用する。そのような酵素調製物としては特に制限

されるものではなく、例えば、微生物の培養物自体、培養物から通常の分離手段（遠心分離、沈殿分離、凝集分離、洗浄、水抽出など）によって分離された菌体、またはその菌体処理物あるいは酵素抽出物を例示することができる。

【 0 0 2 5 】

菌体処理物をさらに具体的に例示すれば、生菌体を適当な緩衝液に懸濁し、超音波処理、フレンチプレス処理などにより物理的に菌体を破碎するか、あるいはリゾチーム処理など酵素的に溶菌させた後、菌体残渣を遠心分離により除去した無細胞抽出液を挙げることができる。

さらに、この無細胞抽出液あるいは前記の酵素抽出物を熱処理、硫酸塩析処理、透析処理、エタノールなどの溶媒処理、各種クロマトグラフィー処理などの酵素精製に通常使用されている処理を単独で、または数種組み合わせて得られる粗精製酵素、精製酵素を例示することもできる。

【 0 0 2 6 】

さらに、上記酵素の遺伝子がクローニングされている場合には、クローン化されたDNA断片を用い、公知の組換えDNA手法で目的とする酵素を調製することも可能である（Science, 277, (5331), 1453-1474, (1997)など参照）。すなわち、遺伝子のクローニング、クローン化したDNA断片を用いた発現ベクターの調製、当該発現ベクターを用いた目的とする酵素活性を有する酵素の調製などは、分子生物学の分野に属する技術者にとっては周知の技術であり、例えば「Molecular Cloning」(Maniatis ら編、Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York(1982))に記載の方法に従って行うことができる。

【 0 0 2 7 】

なお、乳酸菌のヌクレオシドデオキシリボシルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニングと発現に関しては文献（Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2234-2245 (2000)）に記載されており、また大腸菌のヌクレオシダーゼ遺伝子のクローニングと発現に関しても文献（J. Biol. Chem., 276, 884-894 (2001)）に記載されている。

【 0 0 2 8 】

反応に使用するグアノシンおよびGMPとしては、市販のものが使用できる。

また、2'-デオキシリボースの供与体としては市販の2'-デオキシヌクレオシドを使用することができ、特に2'-デオキシピリミジンヌクレオシド、さらに好ましくはチミジンが好適である。

#### 【0029】

2'-デオキシグアノシンの合成反応は、10 mM以上、好ましくは20 mM以上の濃度になるようにグアノシンあるいはGMPと2'-デオキシヌクレオシドを水または緩衝液（pH 3～10）に溶解または懸濁させ、0.001 ユニット／ml以上、好ましくは0.01 ユニット／ml以上のヌクレオシダーゼとヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを使用し、10℃以上、好ましくは30℃以上、70℃以下、好ましくは65℃以下の温度条件で、10分～50時間程度、必要により攪拌しながら反応させることにより実施することができる。

#### 【0030】

上記反応は、ヌクレオシダーゼによりグアノシンあるいはGMPをグアニンとリボースあるいはリボース5-リン酸に分解する際にヌクレオシド・デオキシリボーストランスフェラーゼを反応系に共存させておくことが肝要であり、このようにすることで、生成したグアニンが析出する前にヌクレオシド・デオキシリボーストランスフェラーゼの基質として認識され、速やかに2'-デオキシグアノシンが生成し、グアニンの析出はほとんど観察されない。

#### 【0031】

2'-デオキシグアノシン合成の最適条件は、小規模試験にて決定することができ、たとえば、（1）ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼの酵素活性をヌクレオシダーゼの酵素活性より高めに設定、具体的には2倍以上、好ましくは5倍以上に設定したり、（2）2'-デオキシヌクレオシドの濃度をグアノシンあるいはGMPの濃度より高めに設定、好ましくは2倍以上の濃度に設定することにより、2'-デオキシグアノシンを高収率で合成することが可能である。

#### 【0032】

反応終了後、生成した2'-デオキシグアノシンは核酸関連物質の精製法とし

て通常使用されている方法あるいはこれを応用した方法によって分離精製することができる。例えば、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過法など各種のクロマトグラフィー、向流分配、向流抽出など二液相間の分配を利用する方法、濃縮、冷却、有機溶媒添加など溶解度の差を利用する方法などの2'-デオキシヌクレオシドの分離精製で使用されている一般的な分離精製法を単独で、あるいは適宜組み合わせる行なえばよい。

### 【0033】

#### 【発明の効果】

上述したように、ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼとヌクレオシダーゼを併用（カップリング）する本発明によれば、安価なグアノシンあるいはGMPを基質として2'-デオキシグアノシンを効率的に合成することができ、さらに目的物の単離精製の障害となるグアノシンが反応液にほとんど存在しないため、極めて容易である。

したがって、本発明方法は極めて実用的かつ効率的な2'-デオキシグアノシンの製造法である。

### 【0034】

#### 【実施例】

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明がこれに限定されないことは明らかである。

なお、実施例におけるDNAの調製、制限酵素による切断、T4DNAリガーゼによるDNA連結、並びに大腸菌の形質転換法は全て「Molecular Cloning」（前述）にしたがって行った。また、各種制限酵素、T4DNAリガーゼは全て宝酒造（株）より入手した。

### 【0035】

また、酵素活性の測定と単位の算出は以下の方法で行った。

#### ＜ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼの活性の測定＞

5 mMのチミジンとシトシンを含有する20 mMのMOPS-NaOH緩衝液（pH 6.0）に酵素標品を加えて40℃に保温し、反応終了後、1分間煮沸す

ることにより酵素を失活させた。2'-デオキシシチジンの生成量を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、40℃で1分間に1  $\mu\text{mole}$  の2'-デオキシシチジンを生成する活性を1単位（ユニット）とした。

#### ＜ヌクレオシダーゼの活性の測定＞

5 mM グアノシンもしくはGMPを含む20 mM MOPS-NaOH緩衝液（pH 6.5）に酵素標品を加え、37℃で保温し、反応終了後等量の0.1 N NaOHを加えて反応を停止させる。反応液中のグアニンの生成量を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、37℃で1分間に1  $\mu\text{mole}$  のグアニンを生成する活性を1単位（ユニット）とした。

#### 【0036】

##### 実施例1

##### （1）ヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ-Ⅱの調製

文献（Biosci. Biotechnol. Biochem., 64; 2243-2245(2000)）の方法に従って、乳酸菌*Lactobacillus helveticus* ATCC 8018株のヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（ndtB）のクローニングし、発現プラスミドpTrc-T2F4を作製した。

プラスミドpTrc-T2F4を保持する大腸菌JM109を2xTY培地に接種した。37℃2時間培養後、終濃度0.1 mMになるようにIPTGを添加して5時間培養したのち25℃にて16時間培養してndtB遺伝子を大量発現させた。遠心分離により回収した菌体を破碎用懸濁液（10 mM Tris-HCl（pH 8.0）、1 mM EDTA）に懸濁し、超音波破碎、遠心分離により無細胞抽出液（比活性36.18 units/mgタンパク質）を調製した。

これを、さらに前述の文献の方法に従って、硫安分画、イオン交換クロマトグラフィーの操作により部分精製し、酵素標品（比活性36.69 units/mgタンパク質）を調製した。

#### 【0037】

##### （2）大腸菌ヌクレオシダーゼの調製

##### （2-1）大腸菌ヌクレオシダーゼyaaF遺伝子のクローニング

大腸菌 JM105 株 (ATCC 47016) の染色体 DNA を斉藤と三浦の方法 (Biochim. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)) で調製した。この DNA をテンプレートとして、以下に示す 2 種類のプライマー DNA を常法に従って合成し、PCR 法により大腸菌ヌクレオシダーゼ (yaaF) 遺伝子 (J. Biol. Chem., 276, 884-894 (2001)) を増幅した。

## 【0038】

プライマー (A) : 5'-CTGAATTCGAAAGAGCTGCGTGTGCATATTC-3'

プライマー (B) : 5'-GACTGCAGAATTTGCATAGACCGTTTTTCAGAGTA-3'

## 【0039】

PCR による yaaF 遺伝子の増幅は、反応液 100  $\mu$ l 中 (50 mM 塩化カリウム、10 mM トリス塩酸 (pH 8.3)、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.001% ゼラチン、テンプレート DNA 0.1 mg、プライマー DNA (A) (B) 各々 0.2 mM、Ampli Taq DNA ポリメラーゼ 2.5 ユニット) を Perkin-Elmer Cetus Instrument 社製 DNA Thermal Cycler を用いて、熱変性 (94℃、1 分)、アニーリング (57℃、1.5 分)、ポリメライゼーション (72℃、3 分) のステップを 25 回繰り返すことにより行った。

## 【0040】

遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム (1:1) 混合液で処理し、水溶性画分に 2 倍容のエタノールを添加し、DNA を沈殿させた。沈殿回収した DNA を文献 (Molecular Cloning、前述) の方法に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、1.2 kb 相当の DNA 断片を精製した。該 DNA を制限酵素 EcoRI 及び PstI で切断し、同じく制限酵素 EcoRI 及び PstI で消化したプラスミド pTrc99A (Pharmacia Biotech. 社より入手) と T4 DNA リガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌 JM109 菌を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミド pTrc-yaaF を単離した。

pTrc-yaaF は、pTrc99A の trc プロモーター下流の EcoRI-PstI 切断部位に大腸菌の yaaF 構造遺伝子を含む EcoRI-P

s t I DNA断片が挿入されたものである。

【0041】

(2-2) 大腸菌ヌクレオシダーゼ (Y a a F) の調製

プラスミド p T r c - y a a F を保持する大腸菌 J M 1 0 9 菌を、 $100 \mu\text{l}$  / mg のアンピシリンを含有する 2 x Y T 培地 100 ml に植菌し、 $37^\circ\text{C}$  で振とう培養した。菌体数が  $4 \times 10^8$  個 / ml に達した時点で、培養液に最終濃度 0.2 mM になるように I P T G を添加し、さらに  $37^\circ\text{C}$  で 8 時間振とう培養を続けた。

【0042】

培養終了後、遠心分離 ( $9,000 \times g$ 、10 分) により菌体を回収し、10 ml の緩衝液 (20 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.0)、1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) に懸濁した。超音波処理により菌体を破碎し、さらに遠心分離 ( $20,000 \times g$ 、10 分) により菌体残さを除去した。得られた無細胞抽出液を 1 mM 塩化マグネシウムを含有する 20 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.0) 1 リットル、2 回の透析を行い、透析チューブより回収した液を遠心分離 ( $20,000 \times g$ 、10 分) することで沈殿物を除去した。得られた上清画分を D E A E - トヨパール 650 S 樹脂カラム (50 ml ; (株) 東ソー) に吸着させ、同緩衝液で未吸着試料を溶出した後、200 mM 塩化ナトリウムを含有する同緩衝液を用いて塩濃度の直線勾配をかけることにより吸着試料を溶出させた。

【0043】

ヌクレオシダーゼ活性を有する画分を回収し、これを同緩衝液 1 L で透析した後、M o n o Q カラム (1 ml ; アマシャムーフアルマシア) に吸着させた。未吸着試料を同緩衝液を用いて溶出させた後、続いて 200 mM 塩化ナトリウムを含有する同緩衝液を用いて吸着試料を溶出させた。ヌクレオシダーゼ活性を有する画分を回収した後、同緩衝液 1 L で透析し、得られたヌクレオシダーゼ活性画分を酵素標品とした。なお、酵素標品におけるヌクレオシダーゼ活性は 5.2 ユニット / mg タンパク質であった。

【0044】

(3) チミジンを用いた 2' - デオキシグアノシンの合成



70 mM チミジン、35 mM グアノシンを含む20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) にヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I 0.30 ユニット/ml, ヌクレオシダーゼ 0.06 ユニット/ml となるように酵素標品を添加し、42℃で攪拌しながら32時間反応させた。その結果、31.0 mMの2'-デオキシグアノシンの生成が確認され、グアノシンは検出されなかった。

【0045】

## 実施例 2

### (1) イノシン酸ヌクレオシダーゼの調製

文献 (Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 23, 281-288(1959)) の方法に従って、アスペルギル・オリゼの麹からイノシン酸ヌクレオシダーゼを調製した。

### (2) チミジンを用いた2'-デオキシグアノシンの合成

25 mM チミジン、25 mM GMPを含む20 mM MOPS-NaOH 緩衝液 (pH 6.5) にヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼ I 0.33 ユニット/ml、イノシン酸ヌクレオシダーゼ 0.15 ユニット/ml となるように酵素標品を加え37℃で攪拌しながら18時間程度反応させることで2'-デオキシグアノシンを製造できる。

【0046】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> YAMASA CORPORATION

<120> Process for the preparation of 2'-deoxyguanosine

<130> YP2001-018

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 31

<223> primer for amplification of yaaF gene

<400> 1

ctgaattcga aagagctgcg tgtcgatatt c

31

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 34

<223> primer for amplification of yaaF gene

<400> 2

gactgcagaa ttgcataga ccgttttcag agta

34

特2001-399455

【書類名】 要約書

【要約】

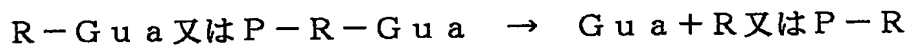
【課題】

4種の2'-デオキシヌクレオシドの中で、塩基であるグアニンの難溶性に起因して、2'-デオキシグアノシンだけがその効率的な製造法が確立されていないのが現状である。

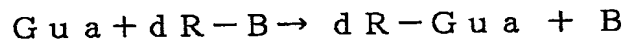
【解決手段】

ヌクレオシダーゼとヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼとを併用し、下記反応式によりグアノシン (R-Gua) あるいはグアノシン5'-モノリン酸 (GMP): (P-R-Gua) と2'-デオキシヌクレオシド (dR-B) から2'-デオキシグアノシン (dR-Gua) を製造する方法に関する。

【式1】



E1 ↓



E2

(式中、Rはリボース、P-Rはリボースリン酸、dRは2'-デオキシリボース、Guaはグアニン、Bは核酸塩基、E1はヌクレオシダーゼ、E2はヌクレオシド・デオキシリボシルトランスフェラーゼを示す。)

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-399455
受付番号	50101922681
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 1月 4日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成13年12月28日

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006770]

1. 変更年月日	1990年 8月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1
氏 名	ヤマサ醤油株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**